

肉桂酸烷基酯的合成及其生物学效应的研究

学校编码: 10384

分类号_____密级

学 号: 21620101152320

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

肉桂酸烷基酯的合成及其生物学效应的研究

The research on synthesis and biological activity of alkyl
cinnamates

祁 闯

指导教师姓名: 王勤 副教授

专 业 名 称 : 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2013 年 5 月 6 日

论文答辩时间: 2013 年 6 月 2 日

学位授予日期: 2013 年 月

答辩委员会主席: 林河通

评 阅 人: _____

2013 年 06 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下, 独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果, 均在文中以适当方式明确标明, 并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外, 该学位论文为(陈清西教授酶学)课题(组)的研究成果, 获得(陈清西教授酶学)课题(组)经费或实验室的资助, 在(陈清西教授酶学)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称, 未有此项声明内容的, 可以不作特别声明。)

声明人(签名): 祁闯

2013年5月27日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

☐ 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

☒ 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）： 祁闯

2013 年 5 月 27 日

目录

摘 要	1
Abstract.....	2
1 前 言	4
1.1 酪氨酸酶	4
1.1.1 酪氨酸酶研究概况	4
1.1.2 酪氨酸酶的活性中心及催化机理	4
1.1.3 黑色素的生成	6
1.2 酪氨酸酶抑制剂研究概述	7
1.2.1 苯甲醛类化合物	7
1.2.2 芪类及其类似物	8
1.2.3 黄酮类化合物	9
1.2.4 杂环化合物	10
1.2.5 天然提取的生物活性物质	11
1.3 酪氨酸酶抑制剂的应用前景	12
1.4 本论文的内容与意义	12
2 实验材料与方法	13
2.1 材料与仪器	13
2.1.1 实验材料	13
2.1.2 实验仪器	14
2.2 实验方法	15
2.2.1 肉桂酸烷基酯的合成与质谱核磁鉴定	15
2.2.2 肉桂酸烷基酯对酪氨酸酶抑制机理的研究	16
2.2.3 肉桂酸烷基酯抑菌活性的测定	16
2.2.4 肉桂酸烷基酯杀虫毒力的测定	17
2.2.5 肉桂酸烷基酯对小菜蛾体内酪氨酸酶基因表达的影响	17
3 实验结果	18

3.1 肉桂酸烷基酯的合成及质谱核磁鉴定	18
3.1.1 肉桂酸甲酯 (Q1) 的合成	19
3.1.2 肉桂酸乙酯 (Q2) 的合成	21
3.1.3 肉桂酸丙酯 (Q3) 的合成	22
3.1.4 肉桂酸丁酯 (Q4) 的合成	24
3.1.5 肉桂酸戊酯 (Q5) 的合成	25
3.1.6 肉桂酸己酯 (Q6) 的合成	27
3.1.7 肉桂酸庚酯 (Q7) 的合成	28
3.1.8 肉桂酸辛酯 (Q8) 的合成	30
3.1.9 肉桂酸壬酯 (Q9) 的合成	31
3.1.10 肉桂酸癸酯 (Q10) 的合成	33
3.2 肉桂酸烷基酯对酪氨酸酶抑制效应	34
3.2.1 肉桂酸烷基酯对酪氨酸酶活力的影响	34
3.2.2 肉桂酸烷基酯对酪氨酸酶抑制机理的判断	36
3.2.3 肉桂酸烷基酯对酪氨酸酶抑制常数的测定	37
3.3 肉桂酸烷基酯抑菌效果的研究	39
3.3.1 肉桂酸烷基酯对白色假丝酵母的抑制效果	39
3.3.2 肉桂酸烷基酯对黑曲霉的抑制效果	40
3.3.3 肉桂酸烷基酯对枯草芽孢杆菌的抑制效果	42
3.3.4 肉桂酸烷基酯对铜绿假单胞菌的抑制效果	43
3.3.5 肉桂酸烷基酯最小抑菌浓度的测定	45
3.4 肉桂酸烷基酯杀虫效果的研究	46
3.4.1 饲喂法测定肉桂酸烷基酯对小菜蛾生长的抑制	46
3.4.2 肉桂酸烷基酯对小菜蛾的杀虫毒力测定	53
3.5 肉桂酸甲酯对小菜蛾体内酪氨酸酶基因表达的影响	54
4 讨论	55
4.1 肉桂酸烷基酯的有机合成	55
4.2 肉桂酸烷基酯对酪氨酸酶二酚酶的抑制作用及其抑制机理	55
4.3 肉桂酸烷基酯的抑菌效果	55

4.4 肉桂酸烷基酯的杀虫效果	56
5 展望	57
参考文献	58
缩略语中英文对照表	65
致谢.....	66

Content

Chinese abstract.....	1
English abstract.....	2
1 Introduction.....	4
1.1 Tyrosinase	4
1.1.1 General Introduction of tyrosinase	4
1.1.2 The active site and catalytic mechanism of tyrosinase.....	4
1.1.3 Tyrosinase and Melanogenesis	6
1.2 Progress in Tyrosinase Ihibitors	7
1.2.1 Benzaldehydes as Tyrosinase inhibitors	7
1.2.2 Stilbenes and analogs on tyrosinase	8
1.2.3 Phenolic hydroxyl derivatives on tyrosinase.....	9
1.2.4 Heterocyclic ring compounds on tyrosinase	10
1.2.5 Active products extracted from plants and animals.....	11
1.3 The application of tyrosinase inhibitors.....	12
1.4 Sinificance and contents of this research	12
2 Material and methods.....	13
2.1 Reagents and instruments	13
2.1.1 Reagents	13
2.1.2 Instruments	14
2.2 Methods.....	15
2.2.1 Synthesis of alkyl cinnamates	15
2.2.2 Assay of the inhibitory effects of alkyl cinnamates.....	16
2.2.3 Assay of antibacterial activity of alkyl cinnamates	16
2.2.4 Assay of the insecticidal activity of alkyl cinnamates.....	17
2.2.5 Assay of the effects of alkyl cinnamates on the expression of insect tyrosinase	17
3 Results	18

3.1 Sythesis of alkyl cinnamates.....	18
3.1.1 Sythesis of Methyl cinnamate	19
3.1.2 Sythesis of Ethyl cinnamate	21
3.1.3 Sythesis of Propyl cinnamate	22
3.1.4 Sythesis of Butyl cinnamate	24
3.1.5 Sythesis of Pentyl cinnamate.....	25
3.1.6 Sythesis of Hexyl cinnamate	27
3.1.7 Sythesis of Heptyl cinnamate	28
3.1.8 Sythesis of Octyl cinnamate	30
3.1.9 Sythesis of Nonyl cinnamate.....	31
3.1.10 Sythesis of Decyl cinnamate	33
3.2 The inhibitory effects of alkyl cinnamates on mushroom tyrosinase....	34
3.2.1 Concentration effects of alkyl cinnamates on the activity of mushroom tyrosinase	34
3.2.2 Inhibitory mechanism of alkyl cinnamates.....	36
3.2.3 Inhibition type and inhibition constants of alkyl cinnamates.....	37
3.3 The antibacterial activity of alkyl cinnamates	39
3.3.1 Antibacterial effects of alkyl cinnamates on <i>Pseudomonas aerugin</i>	39
3.3.2 Antibacterial effects of alkyl cinnamates on <i>Bacillus pumilus</i>	40
3.3.3 Antibacterial effects of alkyl cinnamates on <i>Aspergillus niger</i>	42
3.3.4 Antibacterial effects of alkyl cinnamates on <i>Candida albicans</i>	43
3.3.5 The minimal inhibitory concentration of Propyl cinnamate.....	45
3.4 The insecticidal effects of alkyl cinnamates.....	46
3.4.1 The inhibitory effect of alkyl cinnamates on the body of <i>Plutella</i> <i>xylostella</i> by feeding	46
3.4.2 The median lethal concentration of alkyl cinnamates on <i>Plutella</i> <i>xylostella</i> by feeding	53
3.5 The effect of Methyl cinnamate on the expression of tyrosinase of <i>Plutella xylostella</i>	54

4 Discussion	55
4.1 Sythesis of alkyl cinnamates.....	55
4.2 The inhibitory effects of alkyl cinnamates on mushroom tyrosinase....	55
4.3 The antibacterial activity of alkyl cinnamates	55
4.4 The insecticidal effects of alkyl cinnamates.....	56
5 Out look	57
References	58
Abbreviations	65
Acknowledgement.....	66

摘 要

酪氨酸酶(EC 1.14.18.1)是一种含铜的氧化还原酶,广泛的存在于植物、动物和微生物中,在生物体正常生命活动中起关键作用。近年来,以酪氨酸酶底物结构为母核,设计合成一系列酶抑制剂已受到越来越多实验室的重视。

本论文根据酪氨酸酶底物结构,从构效关系出发,设计合成了一系列肉桂酸烷基酯,研究了其相关生物学效应。首先我们研究了系列肉桂酸烷基酯对酪氨酸酶的抑制效应和抑制机理。然后研究了系列肉桂酸烷基酯的抑菌杀虫效应。最后,利用 RT-PCR 对小菜蛾体内的酪氨酸酶基因表达量进行了研究。

本论文利用二氯亚砷以及 DMAP、EDC.HCL 酯合成方法成功合成系列肉桂酸烷基酯,采用 400 目硅胶过柱,得到纯化的目的产物,并且通过质谱核磁对产物做了进一步的鉴定。

对于系列肉桂酸烷基酯抑制酶活性的研究发现,低碳酯具有较好的抑制活性,其中肉桂酸甲酯和肉桂酸乙酯的 IC_{50} 分别是 1.9mM 和 0.8mM。随着碳链的增长,抑制活性下降。肉桂酸庚醇到肉桂酸癸醇均不表现出抑制活性。

由于酪氨酸酶参与众多生命体活动,在细菌真菌中合成黑色素保护其免受紫外线的伤害。在昆虫中,酪氨酸酶在表皮的黑化,骨针的形成,伤口的愈合起着重要作用,本论文分别以两种细菌和两种真菌以及小菜蛾来研究肉桂酸烷基酯的抑菌杀虫能力。研究发现,低碳肉桂酸烷基酯(肉桂酸甲酯、肉桂酸丙酯、肉桂酸丁酯和肉桂酸己酯)具有较好的抑制细菌真菌能力,其中肉桂酸丙酯对白色假丝酵母、黑曲霉、枯草芽孢杆菌、铜绿假单胞菌的 MIC 分别为 0.5、0.75、0.75、1mg/ml。高碳肉桂酸烷基酯(肉桂酸庚酯、肉桂酸辛酯和肉桂酸壬酯)具有较强的杀虫能力,其中肉桂酸甲酯和肉桂酸壬酯的半致死浓度分别 16.5、12.1mg/ml。最后我们利用 RT-PCR 证明随着肉桂酸甲酯的浓度升高,小菜蛾体内的酪氨酸酶基因表达量随之下降。

关键字: 肉桂酸烷基酯; 酪氨酸酶; 生物学效应

Abstract

Tyrosinase (EC 1.14.18.1), a copper containing enzyme, is ubiquitously distributed in plants, animals and microorganisms. Tyrosinase is the key enzyme in various of normal life activities. In recent years, according to the Tyrosinase substrate as a mother nucleus, synthesize various of inhibitors has aroused more and more interest among many laboratories.

In this study, with structure-activity Relationship of tyrosinase inhibitors, we synthesized a family of alkyl cinnamates. And we study some biological effects. First we study the inhibitory effects and mechanism of alkyl cinnamates against tyrosinase. Then we investigate the antibacterial effects and insecticidal activity of alkyl cinnamates. Last we study the expression level of tyrosinase in vivo of *Plutella xylostella*.

We successfully synthesize alkyl cinnamates by esterification reaction with thionyl chloride and EDC·HCl/DMAP as catalyzators and we get the purified products by Silica gel column. Meanwhile we confirm the structure of these esters by MS and NMR.

By the study of inhibitory effects of alkyl cinnamates, we find that the low hydrocarbon chains esters have better inhibitory effects than the high ones, the IC_{50} of Methyl cinnamate and Ethyl cinnamate on tyrosinase are 1.9mM and 0.8mM. From the Heptyl cinnamate to Decyl cinnamate, they all don't possess the ability to inhibit the tyrosinase activity.

As the tyrosinase takes part in various of normal life activities. In the bacterium, melanins can protect them against UV. In insects, tyrosinase has an important role in normal developmental processes, such as cuticular tanning, scleration, wound healing. In this study, we study the antibacterial effects and insecticidal activity in two bacteriums, two Fungis and *Plutella xylostella*. The results showed that the low hydrocarbon chains esters (Methyl cinnamate, Propyl cinnamate, Butyl cinnamate and Hexyl cinnamate) have better antibacterial effects than high ones, while the high

hydrocarbon chains esters(Heptyl cinnamate、Octyl cinnamate and Nonyl cinnamate) have a more strong insecticidal activity The results showed that the LC_{50} of Methyl cinnamate and Nonyl cinnamate on *Plutella xylostella* were 16.5mg/ml and 12.1mg/ml. Last we prove the expression level of tyrosinase in vivo of *Plutella xylostella* decline gradually with the concentration of Methyl cinnamate increase.

Key Word: Alkyl cinnamate; tyrosinase; biological effect

1 前言

1.1 酪氨酸酶

1.1.1 酪氨酸酶研究概况

酪氨酸酶(EC.1.14.18.1, Tyrosinase)又称为多酚氧化酶、酚氧化酶,是一种结构复杂的多亚基含铜氧化还原酶^[1],广泛的存在植物、动物、微生物和人体中^[1-5]。酪氨酸酶具有双重催化功能。首先催化 L-酪氨酸羟基形成 L-多巴,接着继续氧化 L-多巴形成多巴醌,多巴醌再经过一系列的反应最终生成黑色素^[6,7]。酪氨酸酶参与生物体重要的生理功能,如人体雀斑、褐斑等黑色素过度沉积等疾病发生^[7,8]、昆虫的伤口愈合与发育^[4],同时在细菌中催化形成黑色素防止受到紫外线的伤害^[9,10],其也与果蔬的褐变^[11,12]有密切的关系。因此近年来,关于酪氨酸酶的基础研究已受到国内外越来越多实验室的重视。

1.1.2 酪氨酸酶的活性中心及催化机理

研究表明,酪氨酸酶的活性中心由两个含铜离子位点构成^[13]。催化过程中,双核铜离子位点以三种形态存在,即氧化态(E_{oxy})、还原态(E_{met})、脱氧态(E_{deoxy}) (图 1 所示)^[14]。研究表明酪氨酸酶结合的双核铜离子活性中心与在血蓝蛋白中发现的活性中心相当相似^[15,16]。由 X 射线吸收光谱(XANES)分析,酪氨酸酶和血蓝蛋白含铜活性中心主要构象变化基本相同,铜离子位点的几何构型是可变的。通过血蓝蛋白氧化态结晶学^[17]和 EXAFS^[18]的研究, Cu-Cu 键长约为 3.5Å。这与由酪氨酸酶的晶体结构得到的结论相近, Cu-Cu 键长为 3.4Å^[15]。每个二价铜离子构型为正四棱锥状,受到两个强的赤道面配位原子的调控和一个相对较弱的轴向 N_{his} 配基的调控,形成 5 个配位键。其电子构象为 $3d^9$ ^[19]。即与蛋白上的组氨酸残基上的氮原子形成 3 个配位键,外源氧分子作为过氧化物与铜离子形成两个配位键占据了铜离子的两个赤道面位置,并可作为两个铜离子之间的桥连配体。氧活性中心铜离子的结合模型为 $\mu-\eta^2:\eta^2$, 因此 E_{oxy} 活性中心可以写成 $Cu(I)-O_2-Cu(I)$, 但通常更适合用过氧化态 $Cu(II)-O_2^--Cu(II)$ 表示^[20]。过氧化物的电子结构对于 E_{oxy} 的生物功能很重要。由于受强的 σ^* 受体作用,过氧化物带有较少的负电荷,而 π 电子受体与过氧化物的 σ^* 轨道上的电子作用,大大的削弱了氧氧键,使之容易断裂^[16]。由于酪氨酸酶在非常原始的生物体中也有发现,因此其被认为是血蓝蛋白的祖先蛋白。由于 E_{oxy} 的结构比血蓝蛋白的结构更紊

乱，因而酪氨酸酶存在更多不同构象的底物与其活性中心结合，这与得到的酪氨酸酶晶体结构是相符的。

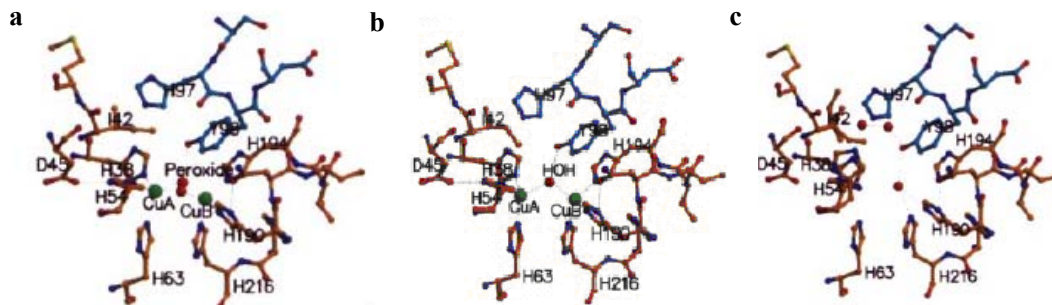


图 1 酪氨酸酶活性中心的氧-铜离子态(a)、铜离子态(b)、亚铜离子态(c)模型。

Fig.1 The mode of E_{oxy} , E_{met} , E_{deoxy} of the active site of tyrosinase.

铜离子态酪氨酸酶与氧-铜离子态类似，都含有两个四角形的反磁铜离子，但是桥连配体是氢氧化物而不是过氧化物。每个亚铜离子电子构象为 $3d^{10}$ [19]，分别与两个吡咯上的氮原子形成两个键长为 1.9\AA 的配位键，与第三个吡咯上的氮原子形成键长为 2.7\AA 的配位键，环绕 Cu-Cu 轴形成近似 C_{3v} 的对称结构[21]。通过酪氨酸酶铜离子态结晶学的研究，酪氨酸酶存在两种铜离子形态 E_{metI} 型和 E_{metII} 型，I 型和 II 型的 Cu-Cu 键长分别为 3.9 和 3.3\AA [15]。当缺少过氧化物时，酶由 E_{oxy} 变为 E_{met} 。纯化后得到的酶是由 $\geq 85\%$ 的 E_{met} 和 $\leq 15\%$ 的 E_{oxy} 组成的混合物[21]，当加入过氧化物，酶从 E_{met} 变为 E_{oxy} 。

脱氧态酪氨酸酶含有一个 2 价铜离子和一个 1 价铜离子[20]。2 价铜离子含有未配对的电子，由电子顺磁共振分析，未配对的电子占据一个 $d_{x^2-y^2}$ 轨道。根据两个铜离子之间电子离域的电子顺磁共振和可见光谱特征，证明在两个铜离子之间同样有桥连配体的存在。由酪氨酸酶亚铜离子态结晶学的研究，Cu-Cu 键长约为 4.1\AA ，铜离子的几何构型与铜离子态的铜离子构型相似[13]。通过对亚铜离子态血蓝蛋白的研究表明： E_{deoxy} 的活性中心由两个一价铜离子组成[21]。

酪氨酸酶具有催化两种不同的反应：羟基化单酚生成二酚（单酚酶活性）和氧化二酚生成醌（二酚酶活性），两个酶促反应都需要氧分子的参与[21]。

根据酪氨酸酶催化双酚和单酚的反应机制，陈清西教授[22,23]曾提出其反应动力学模型（图 2 所示）。如图 2 所示，氧化态的酶（ E_{oxy} ）具有单酚酶活力和二酚

酶活力。羟基化单酚，产生 E_mD 。此时酶既可以氧化双酚生成醌，由 E_{met} 转变为 E_{deoxy} ；又或者释放双酚， E_{met} 结合单酚生成 E_mM 。如果形成的醌很不稳定，当多巴醌存在的时候，双酚可以在反应体系中重复使用，参与一系列的循环反应。这个反应机制，包括了 E_{met} 向 E_{oxy} 的转变和迟滞时间的产生，迟滞时间是酪氨酸酶酶活性的特征^[24,25]。研究发现，双酚浓度与反应体系中最终产物的形成有关^[21]。因为迟滞时间的存在，先形成一种假稳态中间产物，随着双酚浓度的增大，酶转变为最终稳定状态。

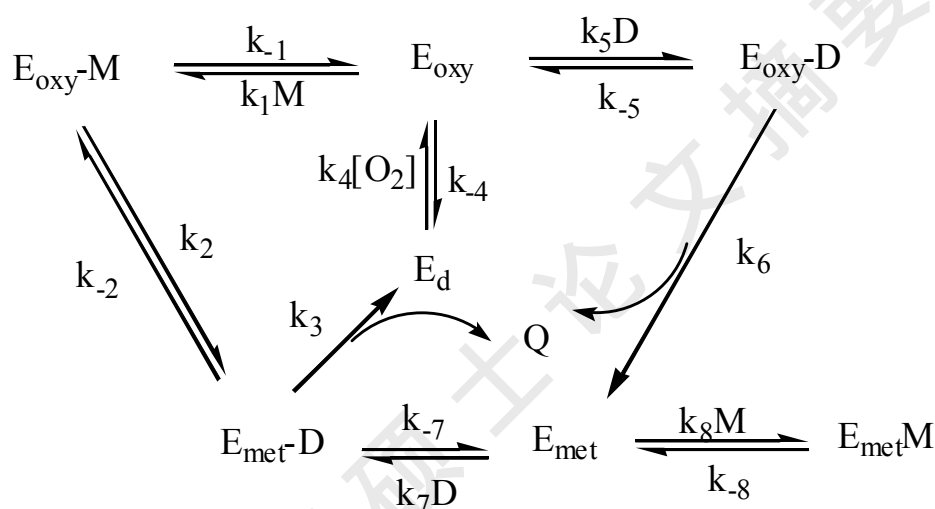


图 2 酪氨酸酶的反应机制的示意图

Fig.2 The reaction mechanism of tyrosinase.

1.1.3 黑色素的生成

酪氨酸酶是生物体合成黑色素的关键酶，黑色素生物合成过程可大体分为两个阶段(图 3 所示)，第一阶段是由酪氨酸酶催化酪氨酸被羟化反应形成 L-3, 4-二羟基丙氨酸(L-多巴)(单酚酶活性)，并进一步将 L-多巴氧化生成多巴醌(二酚酶活性)。这两步反应都是由酪氨酸酶催化，显示其独特的双重催化功能。

第二阶段以多巴醌(DOPAquinon)为底物，从两个不同途径分别生成真黑素和褪黑素。多巴醌经多聚化反应等一系列反应生成无色多巴色素。无色多巴色素极不稳定，被另一分子多巴醌氧化为多巴色素。多巴色素经异构、脱羧生成 5, 6-二羟基吲哚(DHI)。5, 6-二羟基吲哚(DHI)由酪氨酸酶催化氧化为真黑色素的前体吲哚-5, 6-醌，进而生成真黑色素。褪黑素生成过程则为：多巴醌(DOPAquinon)

与半胱氨酸反应生成产生 5-Cys-多巴及 5-Cys-多巴醌，然后成环、脱羧变成苯并噻嗪的衍生物，最后形成褪黑素^[21]。

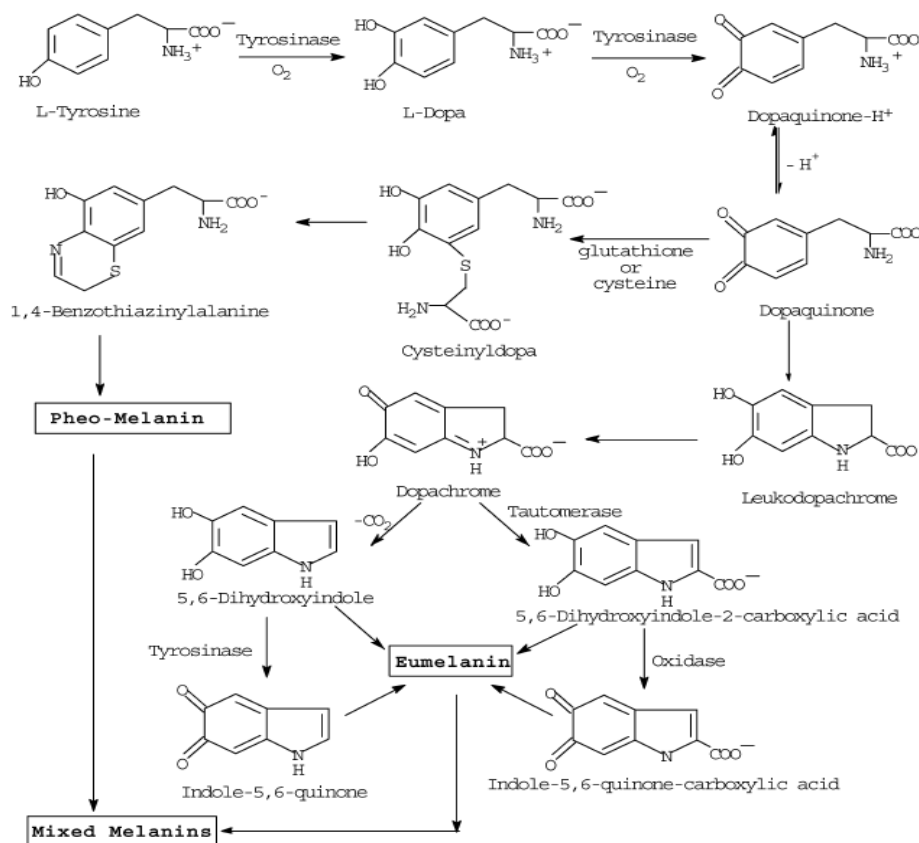


图 3 黑色素的生成途径^[21]

Figure.3 Progress of formation of melanin

1.2 酪氨酸酶抑制剂研究概述

1.2.1 苯甲醛类化合物

苯甲醛类化合物(图 4 所示)是指含有羰基的芳香族化合物，以苯甲醛类化合物为效应物，探究是否具有抑制酪氨酸酶的活性。经过众多科研工作者的研究发现，苯甲醛^[26]、烷基苯甲醛^[27]、烷氧基苯甲醛^[28-30]、卤代苯甲醛^[31]、羟基苯甲醛^[32]等都具有较好的抑制效果。对比上述抑制剂的 IC_{50} ，我们发现对位羟基相对于邻位、间位有更好的抑制效果，如对 2-羟基苯甲醛的 IC_{50} 是 4-羟基苯甲醛的 2.24 倍。

研究认为，苯甲醛类化合物和酪氨酸酶活性中心形成稳定的希夫碱配位化合

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”. Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库